

新規食品の機能性評価 — 桑葉を例にして

亀井 飛鳥^{1*}・阿部 啓子^{1,2}

はじめに

桑は、日本において古くから蚕の餌として栽培されてきた。養蚕によって得られる絹は非常に品質が高く、明治以降には国内の織物産業のみならず、輸出産業にも大きく貢献した。そのため、養蚕業は明治期より産業として大いに発展し、群馬を中心に桑園の耕地拡大がなされた。しかしながら化学合成技術の進歩に伴い、安価に化学合成繊維が出回るようになると、徐々に養蚕業は縮小され始めた。現在もなお、桑園の面積は減少し続けており、2008年（平成20年）において最盛期である1930年（昭和5年）の約350分の1にまで減少している（図1）。現在、養蚕業に利用されているのは桑園の全面積の半分程度（平成20年、農林水産省）である。

桑の葉は、茶として喫されることもある。13世紀、臨済宗の開祖でもある栄西が記した「喫茶養生記」には、桑茶の効果効能についての記載があり、古くより健康茶として親しまれていたことがわかる。筆者らはこの桑葉に着目し、その機能性評価を実施することにした。これまでに、動物試験にて桑葉を摂取させると、血中トリグリセリド（TG）の上昇を抑制すること、また、肝臓を対象とした網羅的な遺伝子発現解析から脂質代謝改善作用、抗炎症作用に至るメカニズムを明らかにし、報告した^{1,2)}。これら基盤研究成果をもとに、桑葉の機能についてヒトにおける機能性を明らかにする目的で研究を開始した。

桑葉の有効成分

桑葉は、アルカロイドの一つである1-デオキシノジリマイシン、フラボノイドであるケルセチン、ケンフェロールなどに富むという特徴を持つ。1-デオキシノジリマイシンは桑葉に特徴的な成分であり、糖尿病改善作用が報告されている³⁾。

トランスクリプトーム解析

生命現象において、遺伝子DNAはその生物固有の情報を持ち、この遺伝子DNAを転写したmRNA（トランスクリプト）を翻訳してタンパク質が作られる。タンパク質が酵素であれば、代謝産物（メタボライト）が生成されることになる。それぞれの群を特に、トランスクリ

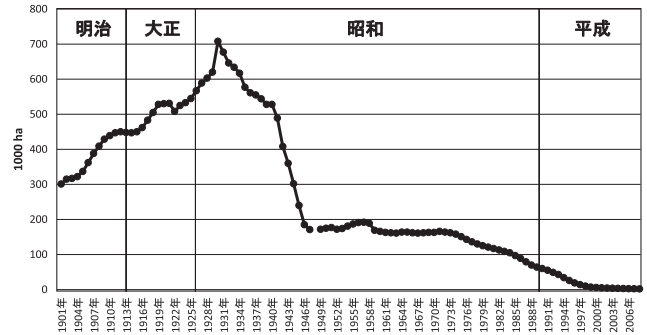


図1. 桑の年次別栽培面積推移。「養蚕に関する調査」(農林水産省 <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaiko/index.html>)を加工して作成。

プトーム、プロテオーム、メタボロームと呼び、網羅的に解析する学問をオミクスと呼ぶ。さらに、mRNAの制御に関与し、病態のマーカー分子として昨今研究が進められているmicro RNAや、エピゲノム解析など、その研究対象は多岐にわたる。

生体内で起こる変化を多角的に解析する手法の一つに、網羅性の高いDNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析がある。これは、細胞内で発現する数万種の転写産物（mRNA, micro RNA）量を網羅的に解析するもので、mRNA, micro RNA量の変化の内容を解読することで、これから起こる生体の変化を予測しようという手法である。

DNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析は、ニュートリゲノミクス（栄養ゲノム科学）の観点から食品や食品成分の健康機能性評価^{1,2,4-15)}や、栄養素欠乏の安全性評価^{16,17)}に広く活用されている。

血液のトランスクリプトーム

食品にはさまざまな機能がある。筆者らはこれまで動物を対象とした試験を行い、さまざまな臓器や脳の網羅的な遺伝子発現解析から食品の機能性を明らかにする試みが続けてきた。一方、昨今では動物で明らかになった機能がヒトにおいても同様であるか、という評価試験の展開が強く求められるようになってきた。しかしながら、ヒトでは組織を採取することが容易ではなく、食品の機能性について動物試験と同様の評価をすることが難しい。また、食品の摂取によりもたらされる効果は長期的にわずかながら起こる変化であることが多く、期間の限ら

*著者紹介 地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所（主任研究員）

¹地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所（KISTEC）、²東京大学大学院農学生命科学研究科

れた試験においては、一般的な既知の血中成分の変化などを捉えることは困難である。そこで、動物、ヒトの両者で採取可能である血液に着目をし、食品を摂取することで発現変動をする血液の遺伝子を新規の食品機能性評価に活用することを検討した。

マーカーとしての活用

筆者らはこれまで、桑葉の機能性評価研究として、動物の肝臓を対象としたトランスクリプトーム解析を行い、脂質代謝改善作用を報告した。この結果をヒトに応用するための試みとして、桑葉を摂取した動物の血液のトランスクリプトーム解析を実施した。これは、動物が食品や栄養素を摂取したときの肝臓の遺伝子発現変化を踏まえたうえで、「肝臓でこのような変化が起きているとき、血液の遺伝子発現はこのように応答する」、すなわち「生体内の状態を反映するマーカー遺伝子」の情報を得ることが目的である(図2)。この実験から、動物が桑葉を摂取することによって発現変動した遺伝子をマーカー遺伝子としてリスト化した。最終的には、ヒトが食品や栄養素を摂取したときの血液の変動遺伝子を前述のマーカー遺伝子リストに照合して肝臓の応答を予測することができるようになれば、ヒトにおける食品・栄養素の機能性・安全性評価への展開が期待される。

ヒト介入試験

北海道情報大学(札幌および江別)にてボランティアを募集し、2か月間の桑葉摂取試験を実施した(UMIN000017916)。

プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験とし、群構成:プラセボ食品摂取群, 桑葉摂取群, 各20名, 対象は、肝機能マーカーの値がやや高く、BMI 23以上30未満の30歳以上70歳未満の日本人男女とし、この基準に合致し、除外基準に該当せず、かつ試験責任医師が適格であると認めた者40名を選択することにした。試験開始前、中間、終了時に下記項目について測定を実施

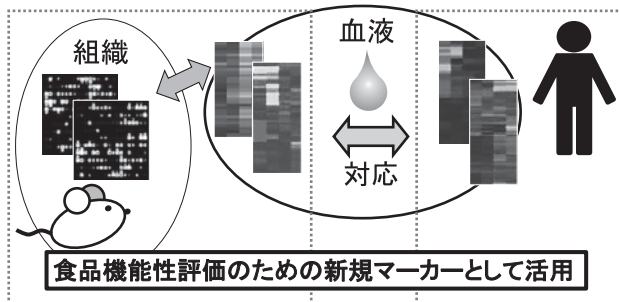


図2. 食品機能性評価マーカーとしての血液遺伝子発現の活用

した。ただし、副次評価項目の④insulin, ⑤血液RNA, ⑥糞便解析については試験開始前、終了時のみの測定とした(図3)。

<主要評価項目>

- ① ALT

<副次評価項目>

- ① 肝機能 (AST, γ -GTP, ALP, LDH)
- ② 脂質関連項目 (T-Cho, HDL-Cho, LDL-Cho, TG, NEFA)
- ③ TP, Alb, T-Bil, A/G比
- ④ 血糖関連項目 (空腹時血糖, HbA1c, insulin)
- ⑤ 血液RNA解析
- ⑥ 糞便解析 (腸内細菌叢)
- ⑦ 体組成 (体重, 体脂肪, BMI)
- ⑧ VAS (visual analogue scale) アンケート (排便, 疲労感など)
- ⑨ NAFLD fibrosis score

<その他の検査項目(背景因子, 安全性評価項目)>

- ① 身長 (スクリーニング時のみ)
- ② バイタルサイン (来所時血圧, 脈拍数)
- ③ 血液一般 (WBC, RBC, Hb, Ht, Plt)
- ④ 腎機能 (BUN, CRE, UA)
- ⑤ 生活習慣アンケート (スクリーニング時のみ)
- ⑥ 日誌

血中生化学パラメーターについては、従来の動物試験より注目していた血中の脂質のうち、コレステロールの変化量について、桑葉摂取群における低下傾向が認められた。

ヒト試験概要

方法: プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験 (UMIN000017916)

対象: 20~70歳の男女 40名

肝機能マーカー, 脂質マーカーがやや高めの健常の方

期間: 2か月, 1日3回

摂取量: 1回2g

摂取サンプル

- ・桑葉食
- ・プラセボ食

解析対象: 血中成分, **血液遺伝子発現**, 腸内細菌叢, その他所見



図3. ヒト試験概要

また、VASアンケート調査により、桑葉摂取群において排便の改善効果が明らかとなった。糞便の腸内細菌叢解析により、プラセボ食摂取群と桑葉摂取群とで摂取前後の変化の方向性が異なる傾向が見いだされた。VASアンケート結果の排便しやすさとの関連が予測される。

さらに血液のトランスクリプトーム解析の結果、プラセボ食摂取群と桑葉摂取群とで、摂取前後で変動する遺伝子の発現パターンが大きく異なることが明らかになった。

血液遺伝子マーカーの有効性

動物試験により、桑葉摂取による血中コレステロールの改善傾向が明らかになり、ヒト試験においても同様の結果が得られた。さらに血液の遺伝子マーカーに着目したところ、動物試験と同様の変動を示すものが桑葉摂取群において多く見いだされた。これらヒトと動物で共通して見いだされたマーカー遺伝子については、特許申請に向けて準備中である。

以上より、桑葉摂取が肝臓の代謝に影響を及ぼすこと、ならびに、食品の機能性評価にあたり、これまでに実施した動物試験による結果がヒトにおいても同様に検出されることが示唆され、動物試験による評価の有効性が併せて示された。

その他、食品の機能性評価としてのヒト介入試験については、富士フィルム株式会社との共同研究にて、東南アジア原産の植物であるサラシアについての評価を実施してきた。動物試験により、サラシア摂取による免疫機能賦活化の作用およびそのメカニズム、また腸内細菌叢の顕著な変動が引き起こされることを明らかにし、報告した⁴⁾。さらに、ヒトを対象としたプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施し、血液中の免疫関連因子の測定および血液のトランスクリプトーム解析を行ったところ、多数の免疫関連遺伝子、特に細胞性免疫(Th1細胞)に関わる遺伝子が発現増加したことが明らかになった。さらに腸内細菌叢解析を実施したところ、腸内でビフィズス菌が顕著に増加することが明らかになった。腸内環境の変化や免疫機能の変化について、動物試験より予測されていた効果がヒトにおいても見いだされる結果となった¹⁸⁾。

このように、モデル動物を用いた試験によって食品の機能性のメカニズムを含む評価を実施し、それをもとにヒト試験へと展開するという一連の研究手法の有効性が示されつつある。さらに血液のトランスクリプトームによってその評価の精度や検出感度がより向上するものと期待される。今後、条件や素材を変えてさらなるデータ蓄積を行い、食品機能性マーカーとしての血液トランス

クリプトームの有効性について検証を進めたい。

農作物としての桑葉とその展開

本研究によって、桑葉の機能性として動物で観察された脂質代謝改善について、ヒト試験においても血中コレステロールの低下傾向という作用が確認された。また、腸内細菌叢を変化させる傾向も認められ、桑葉の機能性がひとつ明らかになった。この動物試験によるメカニズム解明、ヒト試験による検証といった一連の研究成果は、桑葉の機能性を示すものであり、この機能性のエビデンスを活用し、養蚕業に加え、機能性食品として生産、販売へと展開し、桑畑を有効に利用することも期待される。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、北海道情報大学の(教授)西平順先生、西村三恵先生、神奈川県衛生研究所の宮澤真紀先生、東京海洋大学の(助教)小林征洋先生、公益財団法人神奈川科学技術アカデミーの横尾義春氏にご指導、ご協力を賜りました。深謝申し上げます。

本研究の一部は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「【次世代農林水産業創造技術】」(管理法人:生研支援センター)、JSPS科研費26242007、15K12334(K.A.)、15H05346(A.K.)によって実施されました。

文 献

- 1) Kobayashi, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2385 (2010).
- 2) Kobayashi, Y. *et al.*: *J. Pharmacogn. Nat. Prod.*, **1**, 113 (2015).
- 3) Li, Y. G. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1377 (2013).
- 4) Oda, Y. *et al.*: *Biofactors*, **37**, 31 (2011).
- 5) Kondo, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1656 (2010).
- 6) Fukasawa, T. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7007 (2010).
- 7) Yao, R. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 2168 (2010).
- 8) Yao, R. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1635 (2011).
- 9) Watanabe, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2408 (2011).
- 10) Kondo, S. *et al.*: *Benef. Microbes*, **4**, 247 (2013).
- 11) Yamamoto, N. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2413 (2013).
- 12) Yao, R. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e87142 (2014).
- 13) Kamei, A. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1893 (2015).
- 14) Shinozaki, F. *et al.*: *Genes Nutr.*, **11**, 21 (2016).
- 15) Kamei, A. *et al.*: *Mol. Nutr. Food Res.*, doi: 10.1002/mnfr.201600477 (2016).
- 16) Kamei, A. *et al.*: *Physiol. Genomics*, **42**, 149 (2010).
- 17) Kamei, A. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e65732 (2013).
- 18) Oda, Y. *et al.*: *PLoS One*, **10**, e0142909 (2015).